

⑫ 公開特許公報(A)

平3-257366

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成3年(1991)11月15日

G 01 N 33/49
 A 61 B 5/14
 A 61 M 1/14
 G 01 N 33/483
 33/49

3 1 0
 3 5 3

X 7055-2 J
 7831-4 C
 7720-4 C
 E 7055-2 J
 Z 7055-2 J

審査請求 未請求 請求項の数 23 (全 12 頁)

⑭発明の名称 血液回路及びこれを用いた血液測定装置及び血液測定方法

⑯特 願 平2-55037

⑰出 願 平2(1990)3月8日

⑱発 明 者 菊 池 佑 二 茨城県つくば市竹園3丁目108-402

⑲出 願 人 菊 池 佑 二 茨城県つくば市竹園3丁目108-402

⑳代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

血液回路及びこれを用いた血液測定装置
 及び血液測定方法

2. 特許請求の範囲

(1) 一端部に流入口を有し、他端部に流出口を有する窪みを複数個並列配置し、かつこの窪み相互を区画する壁部に、前記流入口と流出口とを結ぶ直線に対しほぼ直交する方向において、窪み相互を連通する微小な溝を有してなる第1の基板と上記第1の基板の表面に接合ないし圧着される平面を有する第2の基板とからなり、上記第1の基板と第2の基板の接合部ないし圧着部に上記窪みおよび溝によって形成される空間を流路として有することを特徴とする血液回路。

(2) 前記溝の幅、深さあるいは形状のいずれかあるいは全てを赤血球、白血球あるいは血小板のいずれかの大きさと形状に合わせることにより、この溝により形成される流路の各血球に対する通過抵抗を異ならしめる、若しくはこの溝により形

成される流路を通過できる血球を限定することを特徴とする請求項1記載の血液回路。

(3) 赤血球、白血球および血小板のいずれかの大きさと形状に合わせた溝が複数種配置されているものである請求項1又は2記載の血液回路。

(4) 赤血球、白血球および血小板にそれぞれ適合した3種類の溝が配置されているものである請求項3記載の血液回路。

(5) 並列配置された複数個の窪みおよびこの窪み相互を区画する壁部に形成された微小な溝よりなる組合せが複数形成されており、各組合せにおける溝はそれぞれ異なる血液有形成分に適合したものとされているものである請求項1ないし4のいずれかに記載の血液回路。

(6) 溝内には狭隘部が多段に設けられていることを特徴とする請求項1ないし5のいずれかに記載の血液回路。

(7) 上記第2の基板が透明であることを特徴とする請求項1ないし6のいずれかに記載の血液回路。

(8) 上記第1の基板がシリコン単結晶からなることを特徴とする請求項1ないし7のいずれかに記載の血液回路。

(9) 請求項1ないし8のいずれかに記載の血液回路の1つの窪みの流入口に血液試料注入装置を接続し、この窪みと並列配置された窪みの流入口に生理食塩水注入装置を接続し、さらに各窪みの流入口近傍、流出口近傍あるいはその両方に制御装置を有する圧力発生源を設けたことを特徴とする血液測定装置。

(10) 並列配置された窪み間を連通する溝により形成される流路部に光を照射する光学系と、該流路部における光の変量を測定する計測系とを有するものである請求項9記載の血液測定装置。

(11) 前記計測系は、流路部からの反射光を測定するものである請求項10記載の血液測定装置。

(12) 前記計測系は、流路部からの蛍光を測定するものである請求項9ないし11のいずれかに記載の血液測定装置。

(13) 血液試料注入装置と接続された窪みの流

— 3 —

(17) 請求項1ないし15のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、血液回路の並列する窪みの間に静水圧差を設けることにより、上記並列する窪みの間を繋ぐ溝により形成される流路に血液の流れを起こらしめ、その後の各窪みでの血液の各有形成分の数の増減あるいは血液の各有形成分による溝流路の閉塞状況を測定し、それにより血液各有形成分の流れ特性あるいは活性度を求めることを特徴とする血液測定方法。

(18) 請求項1ないし15のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、血液回路の並列する窪みの間に設けた生理活性物質の濃度差の下に、並列する窪みの間を繋ぐ溝により形成される流路各部分を移動する白血球の種類、数、移動の速度のいずれかあるいは全てを測定し、それにより白血球各分画の遊走能を求めることを特徴とする血液測定方法。

(19) 請求項1ないし15のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、血液回路の並列する窪みの間に生理活性物質の濃度差を

— 5 —

入口近傍に染色物質注入装置を設けるものである請求項9ないし12のいずれかに記載の血液測定装置。

(14) 血液試料注入装置と接続された窪みの流入口近傍および生理食塩水注入装置と接続された窪みの流入口近傍の少なくともいずれか一方に生理活性物質注入装置を設けるものである請求項9ないし13のいずれかに記載の血液測定装置。

(15) 赤血球、白血球および血小板にそれぞれ適合した3種類の血液回路を有するものである請求項9ないし14のいずれかに記載の血液測定装置。

(16) 請求項1ないし15のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、血液回路の並列する窪みの間に設けた静水圧差の下に、上記並列する窪みの間を繋ぐ溝により形成される流路を流れる血液の各有形成分の分画、数、体積、流連のいずれかあるいは全てを測定し、それにより血液の各有形成分の流れ特性あるいは活性度を求めることを特徴とする血液測定方法。

— 4 —

設けることにより、上記並列する窪みの間を繋ぐ溝により形成される流路を介して白血球の移動を起こらしめ、その後の各窪みでの白血球各分画の数の増減あるいは白血球による溝流路の閉塞状況を測定し、それにより白血球各分画の遊走能、粘着能を求めることを特徴とする血液測定方法。

(20) 請求項1ないし15のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、請求項16ないし19のいずれかに記載の血液測定を、生理活性物質に暴露後の血液試料に対して行なうことを特徴とする血液測定方法。

(21) 請求項1ないし15のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、請求項16ないし20のいずれかに記載の血液測定を、並列配置された窪みおよびこの窪み相互を区画する壁部に形成された微小な溝よりなる各組合せ毎にその間の圧力較差を異ならしめ、それにより上記各組合せの間の回路を流れる血液有形成分の配分を異ならしめて行なうことを特徴とする血液測定方法。

— 6 —

(22) 請求項 1 ないし 15 のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、請求項 16 ないし 21 のいずれかに記載の血液測定を、生理活性物質を回路に流しながら行なうことを特徴とする血液測定方法。

(23) 請求項 1 ないし 15 のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、回路の一部あるいは全てを交換可能にすることを特徴とする血液回路あるいは血液測定装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は血液回路、並びにこれを用いた血液測定装置および測定方法に関するものである。

(従来の技術)

血液中の有形成分である赤血球、白血球、血小板の機能を測定、評価することは、健康管理、疾患の診断と治療に極めて重要である。そこで、従来、赤血球変形能を測定する目的でニュークリポア [Nucleopore] フィルター、ニッケルメッシュフィルター等の微小な孔を持った膜に対する血液

— 7 —

を開発し、かつ、これを用いた赤血球変形能測定装置を開発することにより、孔の径、形状が不均一である、孔に入る際の赤血球の向きが一様でない、変形過程を観察できない、指標の意味が明瞭でない等の従来の赤血球変形能測定法の諸問題を大幅に解決した(特願昭 63-283687 号)。

更に、本発明者らが発明したこの血液フィルターを用いた装置では、個々の赤血球の通過速度を直接計測し、指標としているため、結果自身が目詰まりの影響を受けることはない。しかしながら、依然として目詰まりそのものを防ぐことはできていない。そのため、フィルターの使用回数が制限され、装置実用化の上で大きな障害となっている。

また、従来、他種の血球の干渉を防ぐ目的で、血液試料から単一種類の血球分画だけを分離して測定することが行なわれてきたが、斯様な方法は多大な手間を要するだけでなく、その間の血球の変性あるいは分離処置による変性を防ぐことができず、そのため、結果の生理学的あるいは診断学

— 9 —

の通過能が調べられてきた。また、血小板凝集能の測定には凝集に伴う血小板浮遊液の濃度の変化を測定する方法が行なわれてきた。また、白血球活性度の測定には、白血球活性のいくつかの側面に対応して、ボイデン [Boyden] チャンバー法、粒子貪食試験、化学発光測定法等が行なわれてきた。この白血球活性度は感染症、免疫療法、免疫抑制療法等において特に重要である。

(発明が解決しようとする課題)

しかしながら、上記測定法はいずれも効率の悪さ、再現性の低さ、定量性の低さ等の問題を持っており、重要度に相応しい有効な測定法とは成り得ていない。また、従来の血小板凝集能測定法は試料調整に手間がかかり、感度も十分なものでない。更に、赤血球変形能測定の上記従来技術は、孔あるいは溝が計測中に血液試料中の有形成分により閉塞されてしまうことで、信頼性を欠くものであった。

一方、本発明者らは、先にシリコン基板上に加工した微細な溝から構成される新型血液フィルタ

— 8 —

的価値を低下せしめるものであった。

また、静水圧差による血球の受動的な運動と生理活性物質刺激による血球の能動的運動を完全に分離して測定すること、更に、血球に対する機械的ストレスの影響は研究及び診断上重要であると考えられるが、現在この種の問題を定量的に研究し得る方法はない。上記の本発明者らが発明した装置では、フィルターを多段にすることにより、このような研究を可能にしているが、個々の血球細胞に対する機械的ストレスの影響を追跡測定するところまではできていない。

また、これまで、流路がネットワークを構成した際の各血球の流れの状況を測定、研究する有効な手段がなかった。

したがって、本発明は次に列挙する課題を解決する新規な血液回路、並びにこれを用いた血液測定装置および測定方法を提供することを目的とするものである。

- 1) 白血球活性度を有効に定量化し測定すること、
- 2) 血小板凝集能の測定を従来技術に比べてより

— 10 —

簡便かつ高感度に行なうこと。

3) 赤血球変形能の測定に際しては、血液試料中の有形成分による孔あるいは溝の閉塞を防ぎ、それにより測定の信頼性を高めること。

4) 血液試料から各血球分画を分離しない状態でも、赤血球変形能、白血球活性度、血小板凝集能の計測を可能ならしめること。

5) 上記4の測定にあたり他種の血球の干渉を最小にすること。

6) 生理活性物質のみの作用による特定の血球細胞の遊走も測定し得ること。

7) 機械的ストレスによる各血球細胞の上記機能特性の変化を追跡測定すること。

8) 流路網において各血球細胞の流れの分布を測定すること。

(課題を解決するための手段)

かかる目的を達成するため、本発明は血液試料の全てが微細な溝を通過する従来の方式に代えて、大きな流路に対し略直交方向に微細な溝を形成することで、血液試料の一部のみを大きな流路から

— 1 1 —

の分泌等の諸反応を総合したものであり、しかも、いずれの反応にも細胞内の収縮蛋白質の収縮、運動が関与している。一方白血球の溝閉塞を含めた能動的あるいは受動的溝通過能は細胞内の収縮蛋白質の収縮、運動状態によって著しく変化する。従って、白血球の能動的あるいは受動的溝通過能あるいは溝閉塞は白血球の活性度の適切な指標となる。血小板の凝集も同様に細胞内の収縮蛋白質の収縮、運動が大本の反応であり、従って、血小板の溝通過能あるいは血小板凝集塊による溝閉塞がここでも良い指標となる。また、白血球、血小板に対しては、一定量の生理活性物質で刺激した後の溝閉塞を含めた溝通過能の変化量を指標とすることもできる。

血液試料を大きな流路に対し略直交方向に設けられた微細な溝流路に流す本方式では、試料の大部分を大きな流路に沿って流し、該血液試料のごく一部のみを微細な溝に導くことが可能である。そのため、例えば赤血球に合せた形状の入口を有する微細な溝の場合、白血球あるいは赤血球より

— 1 3 —

微細な溝に導く方式を採用し、併せて半導体微細加工技術を応用することにより基板上に赤血球、白血球ないし血小板の形状にそれぞれ適合した種々の形状、大きさの微細な溝を高精度に作成したものである。血液試料の一部のみでもそこに含まれる血球細胞の数は極めて多数であり、十分の個数の血球について測定することのできるものである。

尚、このように血液試料を大きな流路から微細な溝に導くには該溝の入口側と出口側、即ち血液試料を流す大きな流路となる部位と、この流路と平行しかつ前記溝によってこの流路と連通される別の流路（この別の流路には通常生理食塩水等の生理的に不活性流体が流される。）となる部位との間に静水圧差あるいは生理活性物質の濃度差を生じさせればよい。

また、更に本発明においては上記溝内に狭隘部を多段に設けることも示される。

(作用)

白血球の活性は、遊走、食作用、生理活性物質

— 1 2 —

大きい有形成分例えば血球の凝集塊が入口近傍にきても該溝内に入ることはできず、血液試料の主流に押し流されて溝入口から遠ざかって行くことになる。このようにして白血球あるいは赤血球より大きい有形成分が該溝を閉塞することが防がれる。その際、赤血球に比べて小さい血小板の流入は防ぎ得ないが、血小板が赤血球の通過を障害することはない。同様に、白血球に合せた形状の入口を有する溝の場合、赤血球、血小板は自由に通過するが、白血球の通過に影響を及ぼすことはない。また、蛍光物質で各血球細胞若しくは液体成分のいずれかを蛍光発色させることにより、種類の異なる血球間及び血球と周囲の液体間の識別が極めて容易になる。このように血液試料の流し方、溝入口の形状、測定方式を工夫することにより、径のより大きい血球あるいは有形成分の流入を防ぎながら、測定対象血球細胞による溝閉塞を含めた溝通過能を選択的に測定することが可能になる。また、赤血球、白血球、血小板にそれぞれ適合した3種類の溝回路網および測定方式を並列配置し、

— 1 4 —

それぞれに血液試料を上記の方式で流すことにより、該血液試料中の赤血球、白血球、血小板に対して同時にかつ迅速に測定することも可能となる。

上記の血液試料の流し方は、他方で生理活性物質の濃度差のみによる特定の血球細胞の遊走を測定することを可能にしている。即ち、溝入口側と出口側の間に静水圧差に代えて生理活性物質の濃度差を設けることにより、その生理活性物質の濃度差を認識できる血球細胞のみが溝内に遊走してくる。その個数、通過時間を測定すれば上記目的を達成し得ることになる。

また、狹隘部を同一の溝内に多段に設けることによって、そこを通過して行く血球の追跡が可能になるだけでなく、その通過過程で生じる変化をも同時に追跡して行くことができる。

異なる溝回路網の間の血液各有形成分の配分の仕方、同一回路網内での血液各有形成分の分布状況は従来なかった新しい指標となる。

血液回路を流れる血液若しくはその成分は出口端で回収され、必要に応じて元に戻される、ある

— 15 —

生理活性物質を添加混合する装置 7, 8, 9, 10, 11, 12 から主に構成されており、赤血球変形能測定、白血球活性度測定及び血小板凝集能測定を同時に実施できる。尚、本実施例では、赤血球変形能測定用、白血球活性度測定用及び血小板凝集能測定用の 3 種類の血液回路 1, 2, 3 を別個に形成しているものを使用しているが、これに特に限定されるものではなく、場合によっては 1 つの基板に上述の 3 種類あるいはその他の測定用の血液回路を形成したものを使用することも可能である。この場合、給液路 31, 32 や、圧力測定装置 13, …, 18、回収タンク 33, …, 38 などの付属設備を共用できる。

該装置において、血液試料は注入装置 4 により給液路 31 内に入れられ、送液ポンプ 5 からの液流に乗って各回路 1, 2, 3 まで送られる。給液路 31 内の液体の圧力は各回路 1, 2, 3 の直前で圧力測定装置 13, 15, 17 によって測定される。血液試料は各回路 1, 2, 3 内の血液流路を溝入口面に沿って流れた後、流路抵抗可変装置

— 17 —

いは、別の測定系に運ばれる。

(実施例)

以下、本発明構成を図面に示す実施例に基づいて詳細に説明する。第 1 図に本発明の血液測定装置の構成を概略的に示す。本装置は、血球を通過せしめる 3 種類の血液回路 1, 2, 3 と、各回路 1, 2, 3 の溝を通過する血球の大きさと通過速度を測定する測定装置 26, 27, 28 及びそれら測定値を信号処理しその度数分布を表示する装置 39, 40 と、血液試料を各回路 1, 2, 3 に供給する給液路 31 と、給液路 31 へ血液試料を注入する装置 4 と、送液ポンプ 5, 6 と、給液路 31, 32 内の液圧を測定する圧力測定装置 13, 14, 15, 16, 17, 18 と、流路抵抗可変装置 19, 20, 21, 22, 23, 24 と、上述の送液ポンプ 5, 6 や圧力測定装置 13, …, 18、流路抵抗可変装置 19, …, 24 を制御する制御部 25 と、血液回路通過後の血液を回収する回収タンク 33, 34, 35, 36, 37, 38、各流路 31 の途中にあって螢光物質あるいは

— 16 —

19, 21, 23 を通り回収される。一方、各回路 1, 2, 3 内の別の流路には給液路 32 及び送液ポンプ 6 を経て生理食塩液が送られ、溝出口面に沿って流される。この給液路 32 内の液体の圧力も各回路 1, 2, 3 の入口近傍の圧力測定装置 14, 16, 18 によって測定される。そして、回路入口側と出口側の圧力の測定値を元に送液ポンプ 5, 6 及び流路抵抗可変装置 19, 20, …, 24 が制御部 25 において制御され、溝入口面と出口面の間に所定の静水圧差が設定される。それにより血液試料の一部は溝 65 を通過し、測定に供されることになる。各回路 1, 2, 3 に至るまでに血液試料には必要に応じて螢光物質、生理活性物質が加えられる。各回路 1, 2, 3 の溝を通過する血球細胞は測定装置 26, 27, 28 の顕微鏡拡大投影面上に投影され、その大きさおよび溝通過速度が計測される。必要に応じて螢光法で観察が行なわれる。また、生理活性物質の拡散を溝出口側から入口側へも起こし得るように、溝出口側を流れる生理食塩液にも必要に応じて生理活

— 18 —

性物質が加えられる。各添加装置 7, 8, …, 12 の下流の螺旋状の流路 47, 48, 49, 50, 51, 52 は添加物質の混合を確実にするためのものである。各回路 1, 2, 3 の入口側と出口側の圧力測定装置 13, 14, …, 18 の出力は制御部 25 に送られ、その測定値に基づいて流路抵抗可変装置 19, 20, …, 24 に制御部 25 から制御信号が出力される。

尚、制御部 25 としては、一般に公知のコンピュータが採用が好ましい。

第 2 図 (a) および (b) にそれぞれ本発明の血液回路の構成の一例を示す。表面に流路や溝を構成する窪みや溝を有する第 1 の基板 60 と、この第 1 の基板 60 の表面に接合される平面を有する第 2 の基板 61 とから少なくとも構成されている。第 2 図 (a) に示される実施例は、第 1 の基板 60 に互いに平行な 2 つの縦長な窪み 62, 63 を設け、それら窪み 62, 63 の間を区画する壁部 64 に各窪み 62, 63 とで形成される流路とはほぼ直交する方向の溝 65 を設けたものである。

— 19 —

試料の流れを、また符号 51 は生理食塩水の流れを示す。

このような形状を有する第 1 の基板 60 としては、特に限定されるものではないが、微細加工が容易でかつ血液に対し比較的不活性なシリコン単結晶により構成されるものが好ましく用いられる。このシリコン単結晶板に半導体製造で使用されるエッチングやホトリソグラフィ等によって上述の窪み 62, 63 や溝 65 等が形成される。

この第 1 の基板 60 上には当接面が平面となされた第 2 の基板 61 が接合ないし圧着され、この第 1 の基板 60 と第 2 の基板 61 の接合部ないし圧着部に上記窪み 62, 63 及び溝 65 によって生じる空間で流路が形成されている。尚、この第 2 の基板 61 は流路を通過する血球の光学的な観察が行ない易いように透明なものであることが望ましく、例えばバイレックスガラス等が用いられる。

第 3 図 (a) ~ (d) に、各血液回路 1, 2, 3 の溝 65 を通過する血球の大きさと通過速度を

— 21 —

窪み 62, 63 はその両端に流入口 66 と流出口 67 を夫々設け、流入口 66 から流体を導入して窪み 62 あるいは 63 を通し流出口 67 から排出させるように設けられている。流入口 66 及び流出口 67 は第 1 の基板 60 の厚み方向に貫通しており、第 1 図の血液測定装置の給液路 31 若しくは 32 に連結される。例えば、第 2 図 (d) に示すように、第 1 の基板 60 の下にベース板 68 を接合ないし圧着し、該ベース板 68 に給液路 31 若しくは 32 を接続する引き出し流路 69, 70 を形成している。

また、第 2 図 (b) に示される実施例は第 1 の基板 60 に血液試料を含む流体を流す 1 本の窪み 62 と血液試料を含まない流体を流す 2 本の窪み 63 を互いに平行に設けたものである。この各窪み 62, 63 を相互に区画する壁部 64 には第 2 図 (c) に拡大して示すように、微細な溝 65 が窪み 62, 63 における流路と略直交方向に多数設けられている。尚、第 2 図 (a) 及び (b) において符号 50 はこれらの血液回路における血液

— 20 —

顕微鏡拡大投影面上で計測する方式の一例を示す。この計測方式は、フォトセンサーを用いたもので、顕微鏡拡大投影面上の壁部 64 の溝 65 の入口側及び出口側に相当する部位に貼着ないしパターンニングされたフォトセルあるいは光電面の開口部を有するフォトマルチプライヤーなどのフォトセンサー 71, 72 で検出する光量の変化を利用して血球 73 の大きさと通過速度を測定するものである。第 3 図 (a) の実施例は血球 73 に取り込まれない蛍光物質を加えて液体成分 74 を発光させ、血球 73 を暗部として観測するようにしたものである。その時の血球通過に伴うフォトセンサー 71, 72 の出力の変化を第 3 図 (b) に示す。第 3 図 (c) に示す実施例は血球 73 に取り込まれる蛍光物質を加えて血球 73 自体を発光させ、血球を明部として観測するようにしたものである。その時の血球通過に伴うフォトセンサー 71, 72 の出力の変化を第 3 図 (d) に示す。いずれの場合もフォトセンサー 71, 72 に流れる電流のピークの高さ V が血球の大きさを示し、ピ

— 22 —

ークの間隔 T が通過時間を示す。フォトセンサー71, 72の間隔(距離)は一定であるため、ピークからピークまでの時間 T から血球の通過速度を求めることができる。また、溝65の入口で血球73は変形する。その時間のため溝入口側75では出口側76と比べてピークの幅が広がることになる。従って、ピークの幅の差 $D-D'$ が変形に要する時間を表すことになる。このようにして通過時間から血球73の変形時間を分離して求めることも可能になる。

第4図(a)~(c)に血液回路の溝の一例を示す。以下に、これらの特性が如何に分離されて測定されるかについて述べる。血液試料中の赤血球、白血球、血小板は一樣に各溝の入口面に到達するが、溝入口の所で溝に入れるものと入れないものが分けられる。第4図(a)に赤血球変形能測定用の溝65の一例を示す。この溝65は、狭隘なV字型の溝77Aの前後に深さ4 μm 、幅10 μm の矩形状の溝から成る入口側溝75A、出口側溝76Aが設けられている。そのため、直径が8

— 23 —

トグラムが3次元化されることによって、従来形態の異常のみを2次元的に検出していた場合と比較して、より高度な判定が可能となる。通常の照明、顕微鏡観察では赤血球73Aと周囲の液体74との区別が明瞭にならない場合、蛍光法での観察が行なわれる。その際、赤血球73Aを蛍光物質で標識するのは手間がかかり、赤血球変形能にも悪影響が及ぶので、第3図(a)に示すように、液体成分74を蛍光染色させ、赤血球73Aは影あるいは暗部として観察する方法を用いる。

第4図(b)に、白血球活性度を測定するための溝の一実施例を示す。この白血球活性度測定用溝ではV字型の溝77B及びその前後の台形状の入口側溝75B、出口側溝76Bの寸法が大きく、例えば溝の深さは10 μm となっている。白血球73Bは入口側溝75Bに入り、次に変形してV形溝77Bを通過する。白血球73Bの大きさ、通過速度の測定表示方法は赤血球73Aの場合と同様である。赤血球73Aはこの溝75B, 77B, 76Bを自由に通過するが、白血球の通過を障害

— 25 —

μm 、厚さが2 μm の円盤状の赤血球73Aはこの入口側溝75Aに入れるが、直径が6~10 μm の球状の白血球73Bはこの溝75Aに入ることができない。したがって、白血球73Bは溝と直交する血液試料の主流に流されて溝75Aから遠ざかり詰ることがない。矩形状の入口側溝75Aに入ることにより配向した赤血球73Aは次に変形してV字型の溝77Aを通過する。その通過速度は赤血球73Aの変形能に比例すると考えて良く、前者は後者の適切な指標となる。また、赤血球の大きさは矩形状の入口側溝75A、出口側溝76Aを通過中の配向した赤血球の円盤面の投影像から正確に求められる。個々の赤血球73Aについて得られるこれらの測定値から、赤血球73Aの大きさ、通過速度をそれぞれX, Y軸に取り、それらに対する頻度をZ軸に取ることによって、赤血球の機能特性およびその分布が3次元的に表示される。第7図はこのような血球細胞の大きさと、溝通過時間のヒストグラムの3次元表示例である。このように血球細胞の大きさと速度のヒス

— 24 —

することはない。白血球73Bと赤血球73Aの識別は容易であるが、さらに区別を明瞭にする目的で、蛍光法での観察が行なわれる。白血球73Bはアクリジンオレンジ、アクリジンレッド等の色素で容易に蛍光染色され、第3図(c)のように明部として観察される。白血球73Bが生理活性物質により刺激を受け、能動的な細胞運動を開始するようになると、溝通過速度は著しく低下する。これは外力と細胞内力が拮抗するようになるためである。第5図(a)及び(b)は、この白血球73Bの溝通過能の変化を模式的に示す。この溝通過能およびその変化で白血球の活性度が定量化される。溝65の入口側と出口側の間に静水圧差を設けず、代わりに生理活性物質の濃度差を設けると、白血球73Bは遊走を開始し、溝65を能動的に通過するようになる。このような条件下での溝65を通過する白血球の数、通過速度も白血球活性度の指標となる。

第4図(c)に血小板凝集能測定用の溝の一実施例を示す。この溝では血小板の直径約3 μm に合

— 26 —

った寸法の入口側溝 75C、V形溝 77C、出口側溝 76C が設けられている。入口側溝 75C 内に赤血球 73A、白血球 73B は入ることができず、血小板 73C のみが通過していく〔第 5 図 (c)〕。生理活性物質により血小板 73C の凝集が引き起こされると、第 5 図 (d) に示されるように溝通過が困難になる。血小板凝集塊の大きさと溝通過速度が血小板凝集能の良い指標となる。

第 6 図は同一溝内に V 字型の溝 77D、77E を多段に設けた構造を示す。溝 65 を通過していく個々の血球に対して各段の V 字型の溝 77D、75E の通過速度が計測される。入口側溝 75D と中間溝 78D とに夫々配置されたフォトセンサー (図示省略) によって求められる 1 段目の溝 77D の通過速度を基準に取ることにより、中間溝 78D と出口側溝 76D のフォトセンサー (図示省略) によって求められる次段の V 形溝 77E の通過速度との関係から各段の通過速度の変化が求まる。この変化はそれまでの溝通過即ち変形が血球の機能特性に及ぼす影響を反映する。

— 27 —

り、各種の疾患で血液の形態学的な像が変化するのは症状がかなり進行した後であるのに対して、血液の機能的変化は早期に出現する可能性が高い。また、血液の機能的変化は病態の差を強く反映するものと予想される。

従って、本発明の装置は各種疾患の早期診断、精密診断に貢献する。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は本発明の装置の構成を示す図である。

第 2 図 (a)、(b) は本発明の血液回路を構成する第 1 の基板の構成の一例を示す図、第 2 図 (c) は第 2 図 (a)、(b) の A 部を拡大した図、第 2 図 (d) は血液回路として組立てた実施例を示す縦断面図である。

第 3 図 (a) ~ (d) は溝を通過する血球の大きさと通過時間を求める方式を示す図、第 3 図 (a) は血液回路内の溝を通過していく血球を周囲の液体を蛍光発光させて観測した図、第 3 図 (b) はその時のフォトセンサーの出力の変化を示す図、第 3 図 (c) は血液回路内の溝を通過し

尚、上記各実施例においては、赤血球、白血球および血小板に対する溝の形状、深さ、大きさに関してそれぞれ 1 つずつ具体例を提示したにすぎないが、これらの溝の形状は各血球細胞の形状、測定目的等に応じて種々変更可能である。また、複数種の血液回路をそれぞれ別々の基板に構成することも、1 つの基板の中に構成することも可能である。

(発明の効果)

本発明は、以上説明したように構成されるために、

(1) 血液試料から各血球分画を分離することなく、迅速に赤血球の大きさと変形能の度数分布、白血球の大きさと活性度あるいは刺激に対する応答の度合の度数分布、血小板の大きさと凝集能あるいは凝集塊の度数分布を測定することができ、

(2) また、従来の血液像は、血液中の各血球の数とその大きさの分布の計測値に基づく、形態学的な血液像であるのに対し、本発明の装置は、各血球の機能即ち血液の機能像を与えるものであ

— 28 —

ていく血球を血球を蛍光発光させて観測した図、第 3 図 (d) はその時のフォトセンサーの出力の変化を示す図である。

第 4 図 (a) は赤血球変形能測定用溝の形状の一例を示す図、第 4 図 (b) は白血球活性度測定用溝の形状の一例を示す図、第 4 図 (c) は血小板凝集能測定用溝を示す図である。

第 5 図 (a) 及び (b) は白血球の活性と溝通過能の関係を模式的に示す図、第 5 図 (c) 及び (d) は血小板の凝集と溝通過能の関係を模式的に示す図である。

第 6 図は同一溝内に多段に狭隙部を設けた溝を示す図である。

第 7 図は各血球の大きさと溝通過時間のヒストグラムの表示例を示す図である。

- 1 … 赤血球変形能測定用血液回路、
- 2 … 白血球活性度測定用血液回路、
- 3 … 血小板凝集能測定用血液回路、
- 60 … 第 1 の基板、

— 30 —

— 29 —

- 61…第2の基板、
 62, 63…窪み、
 64…壁部、
 65…溝、
 75A, 75B, 75C, 75D…入口側溝、
 76A, 76B, 76C, 76D…出口側溝、
 77A, 77B, 77C, 77D, 77E…V字形溝、
 78E…中間溝、
 73…血球、
 73A…赤血球、
 73B…白血球、
 73C…血小板、
 74…液体成分。

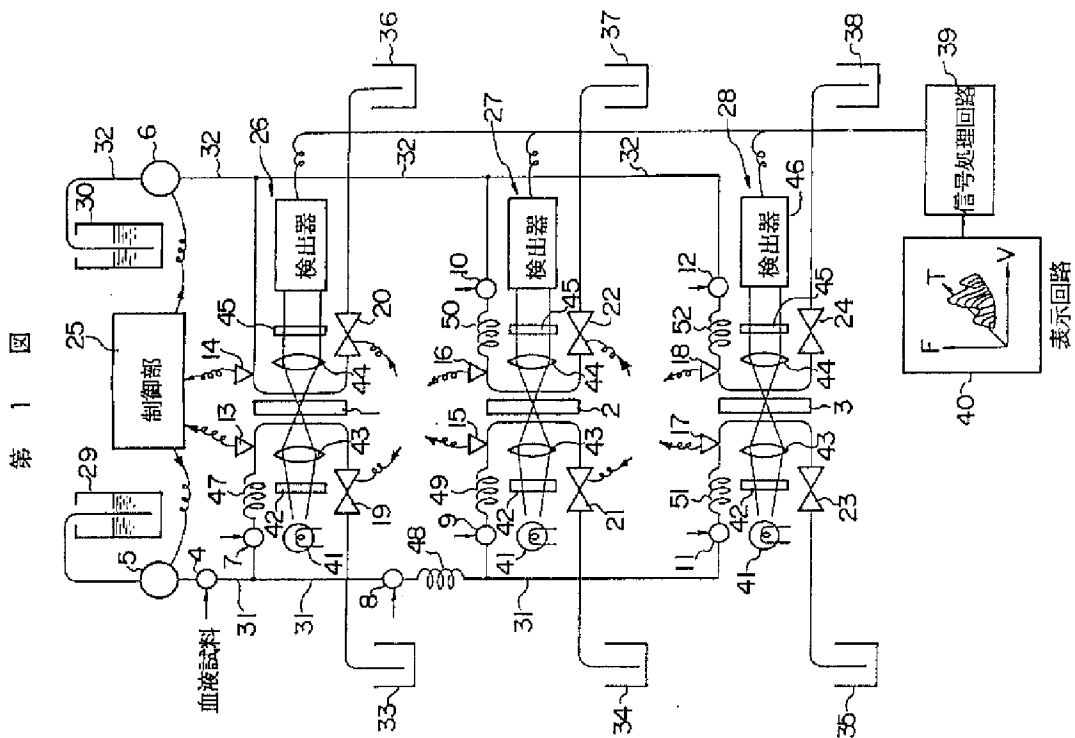
特許出願人 菊池 佑二

代理人 井理士 高木 千尋

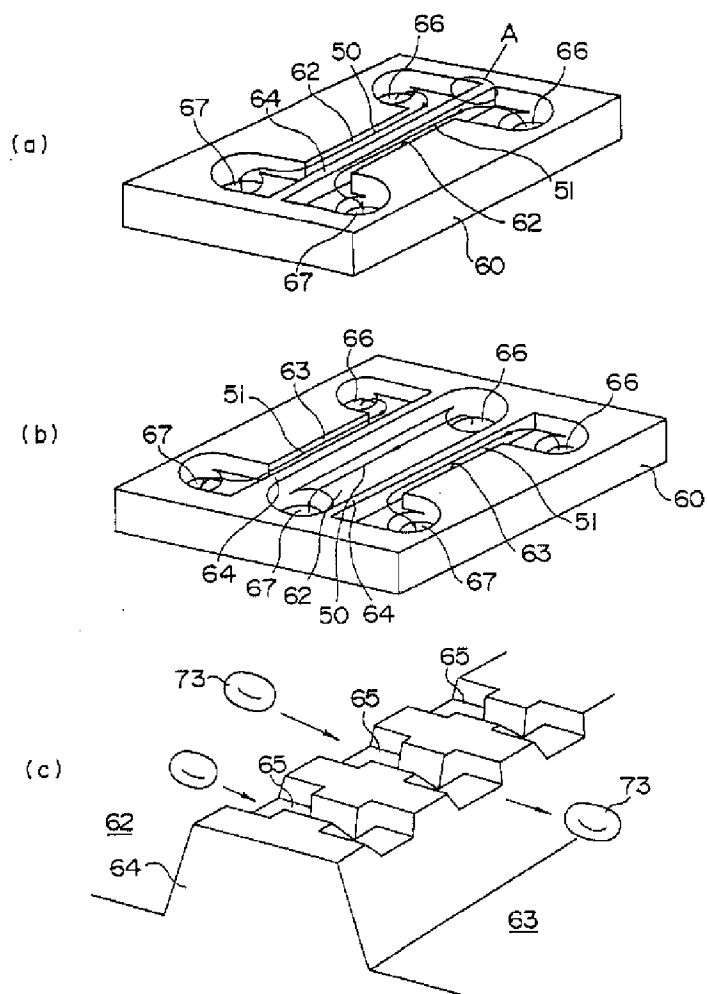
(外2名)



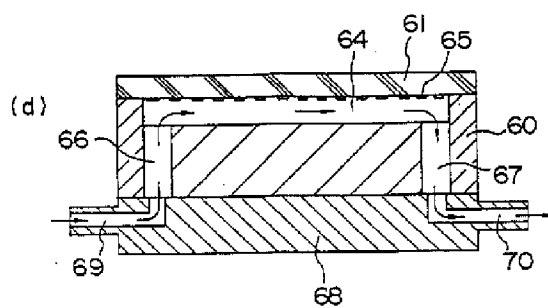
— 31 —



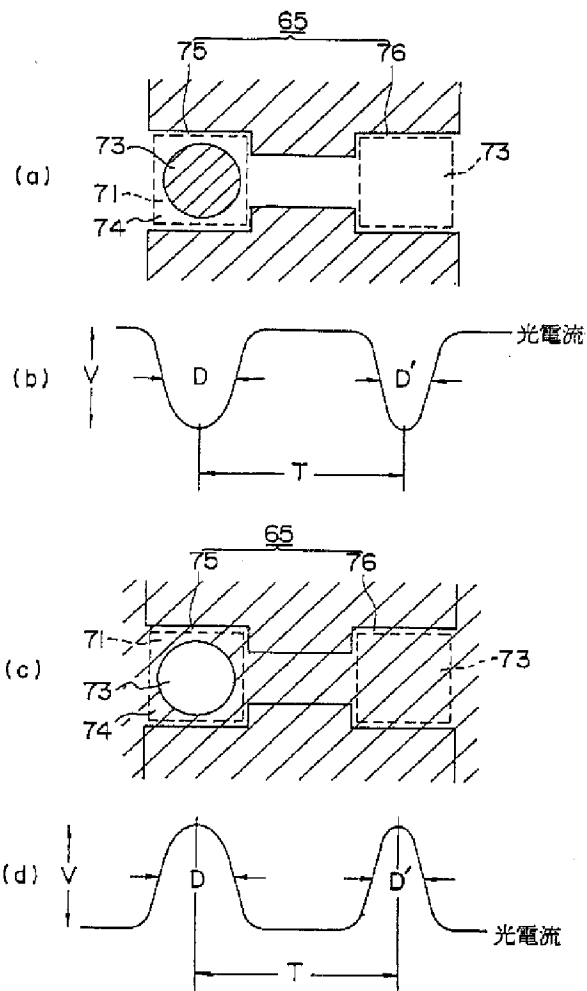
第 2 図



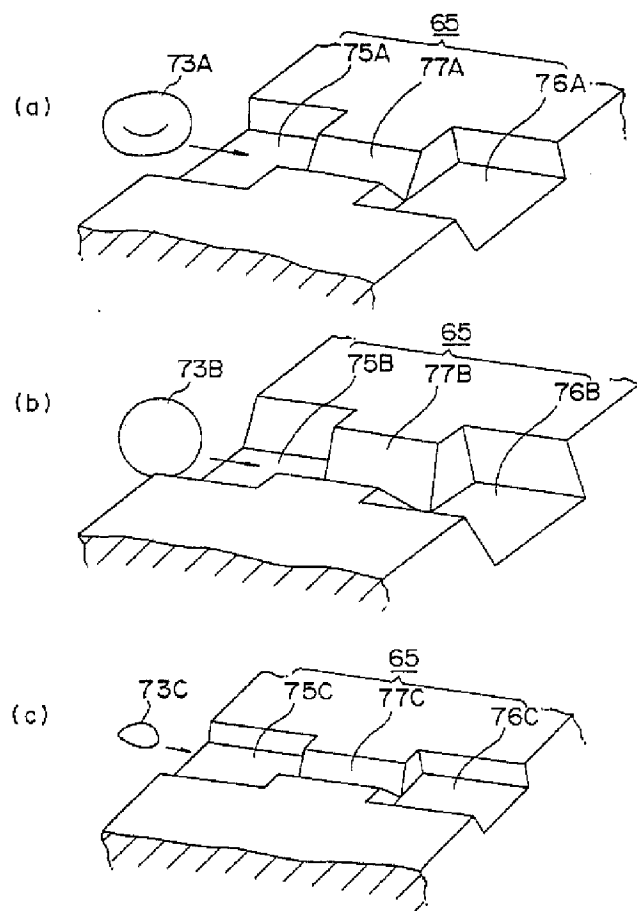
第 2 図



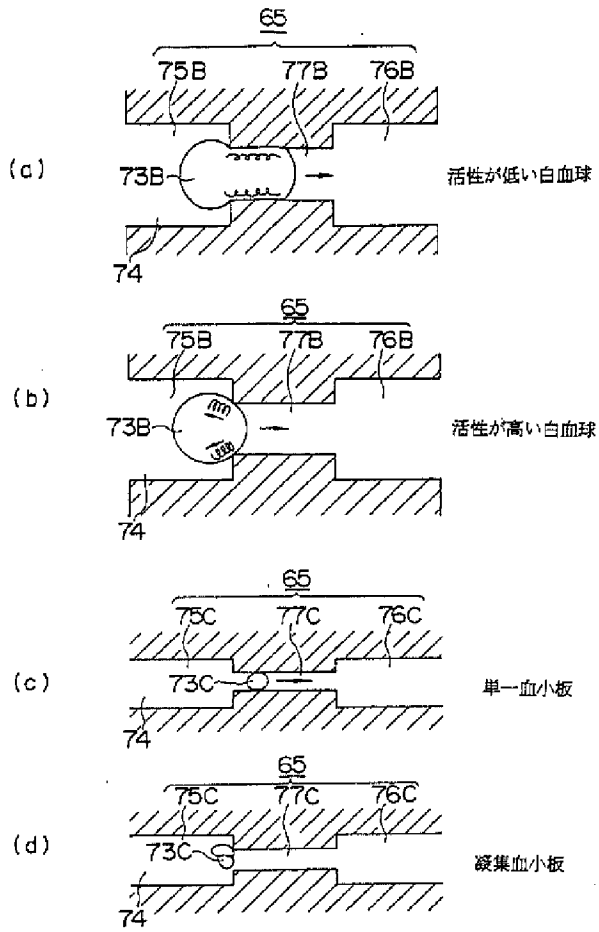
第 3 圖



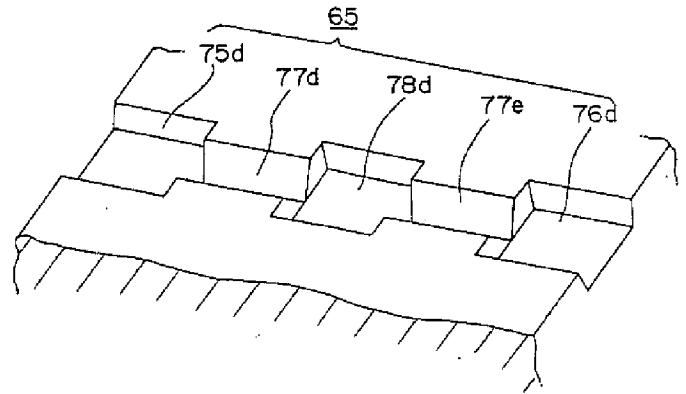
第 4 圖



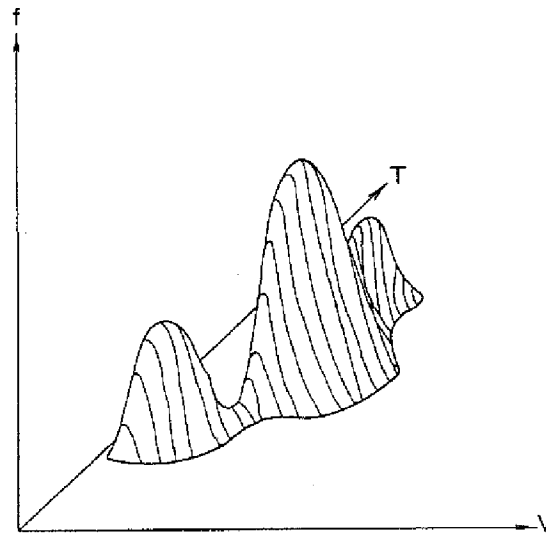
第 5 図



第 6 図



第 7 図



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第6部門第1区分
【発行日】平成7年(1995)7月18日

【公開番号】特開平3-257366
【公開日】平成3年(1991)11月15日
【年通号数】公開特許公報3-2574
【出願番号】特願平2-55037
【国際特許分類第6版】

G01N 33/49 A 7055-2J
X 7055-2J
// A61M 1/14 535 9052-4C

手 続 補 正 書

平成6年8月5日

特許庁長官 高 島 章 殿

7. 補正の内容

- 1) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正します。
- 2) 図面第2～6図を別紙添付の第2～6図のとおり補正します。

以 上

1. 事件の表示

平成2年特許願第55037号

2. 発明の名称

血液回路及びこれを用いた血液測定装置及び血液測定方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 茨城県つくば市竹園3丁目108-402

氏 名 菊 池 佑 二

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区麹町一丁目10番地(麹町広洋ビル)

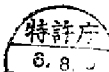
電話 (03) 2022

氏 名 (9173) 高 木 千 寿
(外2名)

5. 補正命令の日付 (自発)

6. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄および図面



2. 特許請求の範囲

- 1) 一端部に流入口を有し、他端部に流出口を有する窪みを複数個並列配置し、且つこの窪み相互を区画する壁部に、前記流入口と流出口とを結ぶ直線に対しほぼ直交する方向において、窪み相互を連通する微小な溝を有してなる第1の基板と上記第1の基板の表面に接合ないし圧着される平面を有する第2の基板とからなり、上記第1の基板と第2の基板の接合部ないし圧着部に上記窪みおよび溝によって形成される空間を流路として有することを特徴とする血液回路。
- 2) 前記溝の幅、深さあるいは形状のいずれかあるいは全てを赤血球、白血球あるいは血小板のいずれかの大きさと形状に合わせることであり、この溝により形成される流路の各血球に対する通過抵抗を異ならしめる、もしくはこの溝により形成される流路を通過できる血球を限定することを特徴とする請求項1記載の血液回路。
- 3) 赤血球、白血球および血小板にそれぞれ適合した3種類の溝のうち複数種が配置されているものである請求項1記載の血液回路。
- 4) 溝内には検量部が多段に設けられていることを特徴とする請求項1ないし3のいずれかに記載の血液回路。
- 5) 上記第2の基板が透明であることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかに記載の血液回路。
- 6) 上記第1の基板がシリコン単結晶からなることを特徴とする請求項1ないし5のいずれかに記載の血液回路。
- 7) 請求項1ないし6のいずれかに記載の血液回路の1つの窪みの流入口に血液試料注入装置を接続し、この窪みと並列配置された窪み

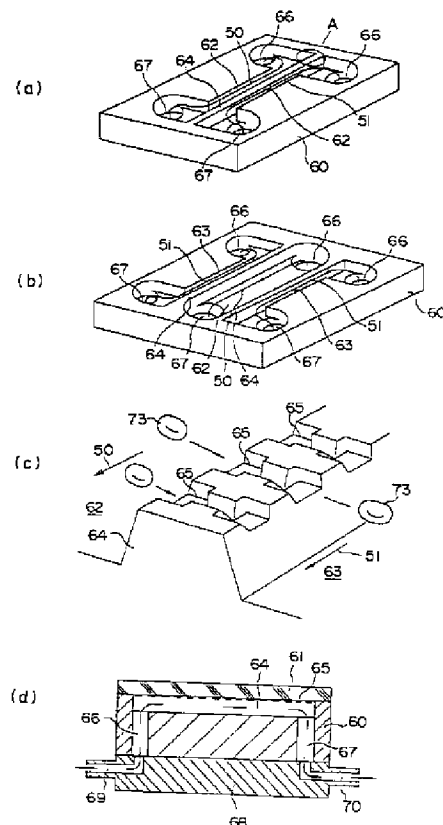
方法。

- 12) 請求項9または10に記載の血液測定を、蛍光物質で各血球細胞もしくは液体成分のいずれかを蛍光発色させて行なうことを特徴とする血液測定方法。

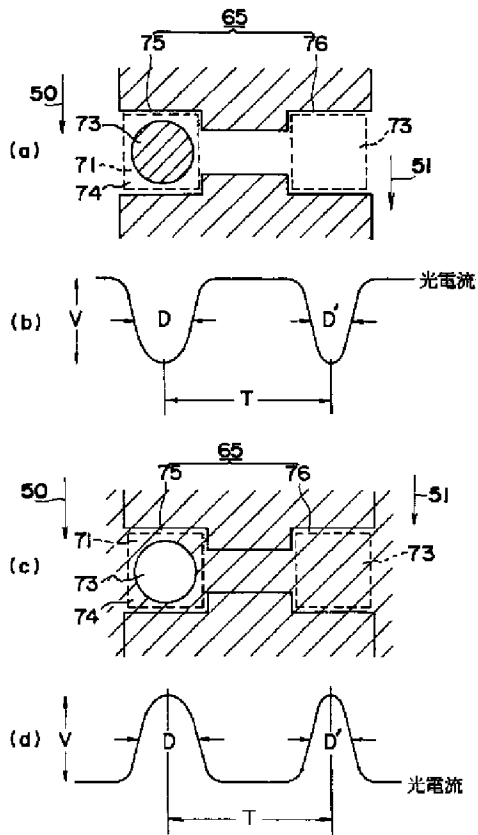
の流入口に生理食塩水注入装置を接続し、さらに各窪みの流入口近傍、流出口近傍あるいはその両方に制御装置を有する圧力発生源を設けたことを特徴とする血液測定装置。

- 8) 並列配置された窪み間を連通する溝により形成される流路部に光を照射する光学系と、該流路部から反射される光ないし該流路部から発射される光の変量を測定する計測系とを有するものである請求項7記載の血液測定装置。
- 9) 請求項1ないし8のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、血液回路の並列する窪みの間に静水圧差を設けることにより、上記並列する窪みの間を繋ぐ溝により形成される流路に血液の流れを起こらしめ、その後の各窪みでの血液の各有形成分の数の増減あるいは血液の各有形成分による溝流路の開塞状況を測定し、それにより血液の各有形成分の流れ特性あるいは活性度を求めることを特徴とする血液測定装置。
- 10) 請求項1ないし8のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、血液回路の並列する窪みの間に生理活性物質の濃度差を設けることにより、上記並列する窪みの間を繋ぐ溝により形成される流路を介して白血球の移動を起こらしめ、その後の各窪みでの白血球各分画の数の増減あるいは白血球による溝流路の開塞状況を測定し、それにより白血球各分画の遊走能、粘着能を求めることを特徴とする血液測定装置。
- 11) 請求項1ないし8のいずれかに記載の血液回路あるいは血液測定装置において、請求項9または10に記載の血液測定を、生理活性物質に暴露後の血液試料に対して行なうことを特徴とする血液測定

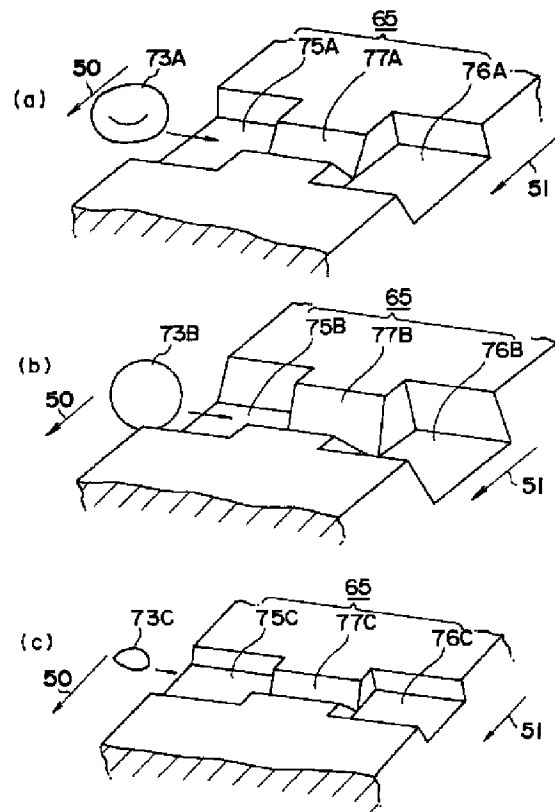
第 2 図



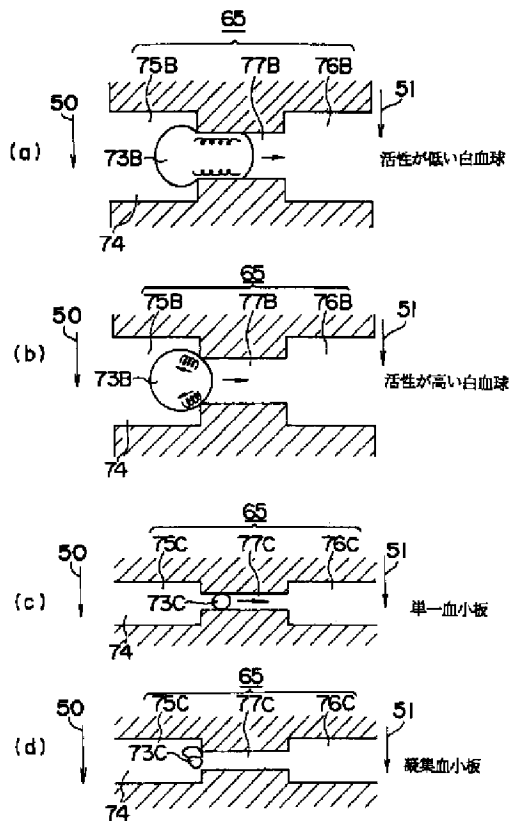
第 3 図



第 4 図



第 5 図



第 6 図

